



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 15/55, 9/14, 15/80, 1/15, C12P 7/18, 7/00, 7/22, 41/00, 13/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/68394 (43) Date de publication internationale: 16 novembre 2000 (16.11.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01217 (22) Date de dépôt international: 5 mai 2000 (05.05.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/05711 5 mai 1999 (05.05.99) FR (71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): ARAND, Michael [DE/DE]; Hauptstrasse 99, D-55246 Mainz-Kastheim (DE). ARCHELAS, Alain, Robert [FR/FR]; 96, Traverse des Fenêtres Rouges, F-13011 Marseille (FR). BARATTI, Jacques [FR/FR]; 2, avenue de la Draille, F-13600 La Ciotat (FR). FURSTOSS, Roland [FR/FR]; 26, chemin des Chalets, F-13009 Marseille (FR). (74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L., 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: EPOXIDE HYDROLASES OF ASPERGILLUS ORIGIN (54) Titre: EPOXYDE HYDROLASES D'ORIGINE ASPERGILLUS (57) Abstract <p>The invention concerns proteins of fungal origin having an epoxide hydrolase activity, such as those obtained in essentially pure form by extraction from fungi cells, or by culturing in host cells transformed by a nucleotide sequence coding for said fungal proteins. The invention also concerns the uses thereof, in particular for implementing methods for preparing enantiopure epoxides and/or diols.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet des protéines d'origine fongique ayant une activité époxyde hydrolase, telle qu'obtenues sous forme essentiellement pure par extraction à partir de cellules de champignons, ou par mise en culture de cellules hôtes transformées par une séquence nucléotidique codant pour les protéines fongiques susmentionnées, ainsi que leurs utilisations notamment dans le cadre de la mise en œuvre de procédés de préparation d'époxydes et/ou de diols énantiomériquement purs.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

EPOXYDE HYDROLASES D'ORIGINE ASPERGILLUS

5

La présente invention a pour objet des protéines d'origine fongique ou des protéines dérivées de ces dernières, ayant une activité époxyde hydrolase, ainsi que leurs utilisations, notamment pour la préparation de molécules énantiomériquement pures (ou énantiopures), tels que des époxydes et/ou des diols vicinaux à haute pureté énantiomérique.

10

Les époxydes ou les diols vicinaux sont des composés importants en synthèse organique. Dans le cas où ils possèdent une structure chirale, ils peuvent être utilisés soit sous forme racémique, soit sous forme optiquement enrichie ou même énantiomériquement pure. Dans le premier cas, ils constituent des produits de base pour l'industrie chimique (monomères polymérisables ou composants de produits industriels tels glycol, propylène glycol etc.). Dans le deuxième cas, ils peuvent être utilisés comme synthons chiraux pour la production de divers produits optiquement purs comme par exemple des molécules biologiquement actives commercialisées par l'industrie pharmaceutique ou phytosanitaire ou de matériaux à propriétés optiques spécifiques (cristaux liquides par exemple).

15

20

C'est pourquoi diverses stratégies de synthèse chimique ont été élaborées pour en réaliser la production. En ce qui concerne l'obtention des diols ces stratégies impliquent souvent l'hydrolyse d'un époxyde en milieu acide ou basique minéral plus ou moins concentré, ce qui génère par-là même des coûts supplémentaires dus au retraitement des eaux mères et/ou des sels formés au cours du procédé.

25

Dans le cas où ces molécules doivent être produites sous forme optiquement active, plusieurs stratégies ont été décrites et développées (Schurig et al. 1992, Pedragosa-Moreau et al. 1995). Par exemple, la réaction d'oxydation de Katzuki-Sharpless permet la transformation d'une oléfine en époxyde optiquement enrichi à l'aide d'un catalyseur organométallique chiral à base de titane. Cependant cette approche est limitée à des oléfines porteuses d'une fonction alcool en position alpha de

30

la double liaison, nécessaire à la coordination du catalyseur.

D'autres méthodes ont été développées plus récemment, et sont elles aussi basées pour la plupart sur l'utilisation de catalyseurs organométalliques impliquant très souvent des métaux lourds comme le manganèse ou le cobalt. Cependant, bien que
5 très efficaces sur certains types de substrats, elles ne présentent que des sélectivités moyennes sur d'autres familles de molécules. Dans tous les cas, elles sont difficilement utilisables au niveau industriel compte tenu des contraintes techniques engendrées par l'utilisation des métaux lourds impliqués.

Diverses méthodologies de biocatalyse ont été décrites afin de palier ce
10 problème. Elles mettent en œuvre des stratégies indirectes impliquant l'utilisation d'enzymes comme par exemple des lipases, des peroxydases ou des monooxygénases (Archelas et al. 1997). Cependant la plupart de ces approches nécessitent l'élaboration de systèmes coûteux de recyclage de cofacteurs, ce qui les rend là encore particulièrement difficiles et onéreuses à mettre en œuvre à un niveau préparatif.

L'utilisation d'une enzyme permettant de réaliser l'hydrolyse directe d'un
15 époxyde constitue donc un moyen original et intéressant de préparation directe d'époxydes optiquement enrichis ou de diols achiraux, racémiques ou optiquement enrichis. Ces enzymes, appelées Époxyde Hydrolases, présentent l'avantage - d'une part de ne pas nécessiter de cofacteur et, d'autre part, - de permettre de réaliser dans
20 des conditions particulièrement douces l'addition d'une molécule d'eau sur un époxyde. Si le substrat est chiral, et selon l'énantiosélectivité et la régiosélectivité de cette addition, le diol obtenu sera racémique ou énantiomériquement enrichi (Archelas et al. 1998).

Bien que de nombreux travaux aient été consacrés à ce type d'enzyme présent
25 chez les mammifères, leur utilisation en synthèse organique n'est pas envisageable compte tenu de la difficulté de les obtenir en quantité suffisante.

La possibilité d'utiliser des époxydes hydrolases d'origine microbienne (bactéries, levures, champignons) -susceptibles d'être produites en grandes quantités par simple fermentation microbienne- comme « outil » en synthèse organique
30 constituerait donc un progrès considérable.

Des exemples de préparation de composés optiquement actifs par l'utilisation de microorganismes en tant que biocatalyseurs ont été décrits, mais ne concernent que

des activités enzymatiques non caractérisées détectées dans divers microorganismes. Ainsi, dans la demande de brevet européen EP n° 611 826 (Daicel Chemical Industries Co., LTD), les exemples de microorganismes donnés, capables de produire un époxyde (S) optiquement actif à partir d'un époxyde racémique, sont notamment
5 une souche de microorganisme appartenant au genre *Candida*, *Rhodospiridium*, *Rhodococcus* et *Nosardioides*. Les exemples de microorganismes capables de produire un époxyde (R) optiquement actif, sont notamment une souche de microorganisme appartenant au genre *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, et *Brevibacterium*.

10 L'oxyde de styrène est l'un des substrats test le plus utilisé dans les études conduites sur les époxyde hydrolases de mammifères, et divers dérivés substitués sur le cycle aromatique de ce substrat modèle ont aussi été étudiés dans ce contexte (Dansette et al. 1978, Westkaemper et al. 1981). Plus récemment, les études réalisées avec des activités enzymatiques d'origine microbienne ont aussi utilisé ce substrat
15 modèle, et les Inventeurs ont eux-mêmes montré que ces molécules peuvent être hydrolysées de façon énantiosélective par une souche du champignon *Aspergillus niger*, enregistrée au Muséum d'Histoire Naturelle (Paris) sous le numéro LCP521 (Lab. de Cryptogamie, 12 rue Buffon, 75005 Paris, France) (Pedragosa-Moreau et al. 1996).

20 Toutefois, les expériences d'hydrolyse énantiosélective effectuées à l'aide de champignons, tel que le champignon *Aspergillus niger*, décrites jusqu'à présent, font intervenir les cellules entières ou des extraits cellulaires du champignon, ce qui pose un certain nombre de problèmes techniques de mise en œuvre, ne donne pas de bons rendements, et ne permet pas de définir la structure du catalyseur biologique utilisé.

25 L'utilisation d'époxydes hydrolases d'origine fongique bien identifiées et caractérisées permettrait de remédier à ces inconvénients, mais aucune époxyde hydrolase d'origine fongique n'a pu être isolée et purifiée jusqu'à présent, suggérant la possibilité qu'une telle enzyme n'était pas suffisamment stable pour être totalement isolée de son milieu naturel.

30 La présente invention résulte de la mise en évidence par les Inventeurs du fait qu'il est possible d'isoler et de purifier une époxyde hydrolase à partir de champignons. Ainsi la présente invention découle de l'identification (par purification, séquençage, clonage) de l'enzyme responsable de l'activité époxyde hydrolase des champignons, tels que

ceux de l'espèce *Aspergillus*.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouvelles enzymes à activité époxyde hydrolase d'origine fongique.

Un autre but de la présente invention est de fournir les séquences nucléotidiques codant ces enzymes.

L'invention a également pour but de fournir des cellules hôtes transformées par les séquences nucléotidiques susmentionnées, dans lesquelles lesdites enzymes sont avantageusement surexprimées.

L'invention a aussi pour but de fournir des procédés d'obtention desdites enzymes, notamment par extraction et purification à partir de cellules de champignons, ou par mise en culture de cellules hôtes telles que décrites ci-dessus.

Un autre but de la présente invention est de fournir de nouveaux procédés de biocatalyse à l'aide des enzymes susmentionnées ou des cellules hôtes productrices desdites enzymes décrites ci-dessus, pour la synthèse de divers époxydes et/ou diols, ces procédés présentant des rendements supérieurs aux procédés utilisant des cellules entières, ou des extraits cellulaires de champignons précédemment décrits.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour but de fournir des procédés d'hydrolyse d'époxydes achiraux ou chiraux présentant l'avantage de pouvoir être effectués dans des conditions expérimentales particulièrement douces, à savoir sans mettre en œuvre de réactif acide ou basique minéral ou organique, notamment en milieu aqueux tamponné ou non tamponné et/ou en présence de solvants organiques miscibles ou non miscibles à l'eau. Selon les propriétés stéréochimiques intrinsèques de l'époxyde de départ, ces procédés conduisent à l'obtention d'un diol achiral, racémique ou optiquement enrichi ainsi que, si l'époxyde de départ est chiral, à la production de l'un de ses deux énantiomères sous forme optiquement enrichie, voir énantiomériquement pure.

L'invention a pour objet toute protéine d'origine fongique ayant une activité époxyde hydrolase, telle qu'obtenue sous forme essentiellement pure par extraction à partir de cellules de champignons, ou par mise en culture de cellules hôtes transformées par une séquence nucléotidique codant pour la protéine fongique susmentionnée, ou pour toute protéine dérivée par substitution, suppression ou

- 5 -

addition d'un ou plusieurs acides aminés de la protéine d'origine fongique susmentionnée et possédant une activité époxyde hydrolase.

L'activité époxyde hydrolase susmentionnée peut être mesurée en utilisant l'oxyde de *para*-nitrostyrène (pNSO) comme substrat, et en mesurant la quantité de diol formé, notamment selon la méthode suivante :

50 μ L de la préparation contenant l'enzyme sont ajoutés à 410 μ L du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,0 (tampon B) et le mélange est pré-incubé à 35°C pendant 2 min. Ensuite, on ajoute 40 μ L d'une solution 50 mM de pNSO racémique dans le DMF (concentration finale de pNSO : 4 mM).

Après 10 min d'incubation, la réaction est stoppée par addition de 1 mL de dichlorométhane. Le mélange est agité vigoureusement afin d'extraire à la fois le substrat et le diol produit. La quantité de diol formée est déterminée après séparation sur colonne de silice par HPLC (chromatographie liquide haute pression) (Waters Associates, USA) tel que décrit précédemment (Nellaiah et al., 1996).

Une Unité époxyde hydrolase représente la quantité d'enzyme qui catalyse la formation d'une μ mole de diol par minute dans les conditions ci-dessus. Après incubation avec des extraits bruts, la quantité de diol formée augmente linéairement avec le temps pendant au moins 30 min, et la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration de l'enzyme dans la gamme de 0,01 à 1,2 unités (Nellaiah et al., 1996).

L'invention a plus particulièrement pour objet toute protéine telle que décrite ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence SEQ ID NO : 2,

- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, et possédant une activité époxyde hydrolase, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 40 %, notamment supérieure à environ 80 %, avec la séquence SEQ ID NO : 2,

- ou tout fragment de la séquence SEQ ID NO : 2, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, et possédant une activité époxyde hydrolase, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins

environ 10 acides aminés contigus dans la région délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 339 de la séquence SEQ ID NO : 2.

L'invention concerne plus particulièrement toute protéine décrite ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle correspond à une époxyde hydrolase fongique sous forme essentiellement pure, telle qu'obtenue par extraction et purification à partir de cultures de cellules de champignons de l'espèce *Aspergillus*.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet toute protéine susmentionnée, caractérisée en ce qu'elle correspond à l'époxyde hydrolase fongique sous forme essentiellement pure représentée par SEQ ID NO : 2, telle qu'obtenue par extraction et purification à partir de cultures de cellules de souches d'*Aspergillus niger* ou d'*Aspergillus turingensis*.

L'invention concerne également toute protéine telle que décrite ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle correspond à une époxyde hydrolase fongique recombinante, telle qu'obtenue sous forme essentiellement pure par transformation de cellules hôtes appropriées à l'aide de vecteurs contenant :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2, ou toute séquence dérivée de SEQ ID NO : 1 par dégénérescence du code génétique, et codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2,

- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 1, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 45 %, notamment supérieure à environ 80 %, avec la séquence SEQ ID NO : 1,

- ou tout fragment de la séquence SEQ ID NO : 1, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, et codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 20 nucléotides contigus dans la région délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 1197 de la séquence SEQ ID NO : 1.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet l'époxyde hydrolase fongique recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, telle qu'obtenue par transformation de cellules hôtes appropriées à l'aide de vecteurs

- 7 -

contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1, ou toute séquence dérivée de SEQ ID NO : 1 par dégénérescence du code génétique, et codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique codant une protéine d'origine fongique à activité époxyde hydrolase telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique susmentionnée, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence représentée par SEQ ID NO : 1 codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2,

- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 1 par dégénérescence du code génétique, et codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2,

- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 1, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 45 %, notamment supérieure à environ 80 %, avec la séquence SEQ ID NO : 1,

- ou tout fragment de la séquence SEQ ID NO : 1, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, et codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 20 nucléotides contigus dans la région délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 1197 de la séquence SEQ ID NO : 1,

- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

- ou toute séquence nucléotidique codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, et susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments susmentionnés,

les séquences ou fragments susmentionnés étant sous forme simple brin ou double brin.

L'invention concerne également tout vecteur, notamment plasmide, contenant une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus.

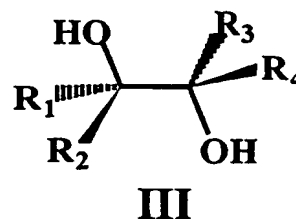
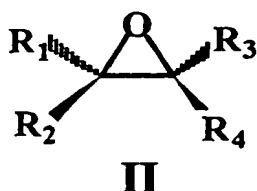
Avantageusement, les séquences nucléotidiques de l'invention dans les vecteurs susmentionnés, sont placées sous le contrôle d'éléments de régulation de l'expression des protéines à activité époxyde hydrolase définies ci-dessus, notamment d'un promoteur, le cas échéant inductible, et un terminateur de transcription.

De préférence, le promoteur susmentionné est choisi parmi ceux permettant une surexpression desdites protéines dans des cellules hôtes transformées à l'aide des vecteurs, lesdites cellules hôtes étant elles-mêmes choisies parmi celles capables de surexprimer lesdites protéines, notamment parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères.

L'invention concerne également toute cellule hôte, choisie notamment parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, ladite cellule hôte étant transformée, notamment à l'aide d'un vecteur tel que défini ci-dessus, de manière à ce que son génome contienne contenant une séquence nucléotidique susmentionnée codant une protéine à activité époxyde hydrolase.

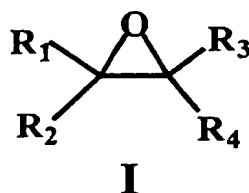
L'invention a également pour objet l'utilisation de protéines à activité époxyde hydrolase telles que définies ci-dessus, en tant que biocatalyseurs enzymatiques dans le cadre de la mise en œuvre de procédés de préparation d'époxydes ou de diols vicinaux énantiomériquement purs, notamment dans le domaine pharmaceutique, phytosanitaire, ou dans le cadre de la fabrication de matériaux optiques spécifiques.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation d'époxydes et/ou de diols énantiomériquement purs respectivement de formules (II) et (III) suivantes



dans lesquelles R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent des groupes quelconques, notamment des groupes caractéristiques des composés pharmaceutiques, phytosanitaires, ou des matériaux optiques spécifiques correspondant auxdits époxydes ou diols vicinaux,

ledit procédé comprenant une étape de traitement d'un mélange d'époxydes diastéréoisomères, ou d'un époxyde chiral sous forme racémique, ou d'un époxyde prochiral de formule (I) suivante :



avec une protéine à activité époxyde hydrolase telle que définie ci-dessus, ou avec des cellules hôtes susmentionnées exprimant ou surexprimant une protéine à activité époxyde hydrolase telle que définie ci-dessus, ce qui conduit à l'obtention :

- d'un mélange des composés de formule (II) et (III) susmentionnés, lesdits composés de formule (II) et (III) pouvant, le cas échéant, être séparés par une étape supplémentaire de purification,

- ou du seul composé de formule (III) susmentionnée.

Dans le cas de l'obtention du seul composé de formule (III) susmentionnée, celle-ci peut se faire par un traitement concomitant ou subséquent au traitement décrit ci-dessus, notamment avec un autre réactif chimique ou enzymatique en fonction de l'époxyde de départ, par exemple avec de l'acide sulfurique, notamment dans le cas de l'oxyde de *para*-nitrostyrène (Pedragosa-Moreau et al., 1997), ou avec des cellules du champignon *Beauveria sulfurescens*, notamment dans le cas de l'oxyde de styrène (Pedragosa-Moreau et al., 1993).

Avantageusement, lorsque le procédé tel que décrit ci-dessus selon l'invention, est effectué à l'aide d'une protéine à activité époxyde hydrolase telle que définie ci-dessus, cette dernière peut être immobilisée sur un support solide

tel que par exemple le DEAE cellulose ou le DEAE Sepharose, ou tout autre support ou technique permettant d'immobiliser cette enzyme.

L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation d'une protéine à activité époxyde hydrolase telle que définie ci-dessus, sous différentes formes, incluant des cellules hôtes transformées telles que décrites ci-dessus, ou des cellules entières de champignons, tel que *Aspergillus niger*, produisant cette enzyme, ou des extraits enzymatiques solubles ou lyophilisés desdites cellules, ou l'enzyme immobilisée sur un support solide tel que défini ci-dessus, dans le cadre de la mise en œuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus d'hydrolyse d'un époxyde achiral.

L'invention concerne également un procédé de préparation de protéine à activité époxyde hydrolase recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de transformation de cellules hôtes, de préférence choisies parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, avec un vecteur tel que décrit ci-dessus, et une étape de purification de l'époxyde hydrolase recombinante produite par lesdites cellules.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'une époxyde hydrolase fongique sous forme essentiellement pure, ledit procédé comprenant :

- une étape d'extraction de l'enzyme à partir de cultures cellulaires de champignons, tels que les champignons de l'espèce *Aspergillus*, notamment par cassage du champignon à l'aide d'une presse de French ou de tout autre moyen approprié, suivie d'une étape de centrifugation à faible vitesse (environ 10 000 g), récupération du surnageant, et concentration par ultrafiltration,

- une étape de purification de l'enzyme à partir de l'extrait obtenu à l'étape précédente, notamment par passages successifs sur des colonnes de DEAE-Sepharose, Phényl-Sepharose, Mono Q et Superose 12.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la purification de l'époxyde hydrolase d'une souche du champignon *Aspergillus niger*, ainsi que du clonage du gène codant cette époxyde hydrolase, et d'exemples d'application de mise en œuvre d'un procédé selon l'invention.

A) Purification et caractérisation d'une époxycyclase d'*Aspergillus niger* à haute énantiosélectivité

I) Matériels et Méthodes

1) Réactifs

Le substrat test utilisé est l'oxyde de p-nitrostyrène racémique (pNSO). Il est synthétisé à partir de ω -bromo-4-nitro acétophénone selon une méthode décrite par Westkaemper et Hanzlik, 1980. Ses énantiomères purs (R) et (S) sont obtenus à partir de ce substrat racémique par une étape de biotransformation (Pedragosa-Moreau et al., 1996). Le diéthylaminoéthyl (DEAE)-Sephacrose, le phényl-Sephacrose, les colonnes "Mono Q" et Superose 12 proviennent de chez Pharmacia LKB (Uppsala, Suède). H₂ [¹⁸O] provient de chez Isotec (Miamisburg, USA) et présente une teneur de 95 % de [¹⁸O]. Toutes les chromatographies de protéines sont réalisées à l'aide du système FPLC Pharmacia à 4°C.

2) Organismes, conditions de croissance et préparation d'extraits

La souche du champignon *Aspergillus niger* utilisée dans cette étude est enregistrée au Museum d'Histoire Naturelle (Paris) sous le numéro LCP521 (Lab. de Cryptogamie, 12 rue Buffon, 75005 Paris, France). La culture est effectuée dans un fermenteur d'une capacité de 5L (volume liquide) dans les conditions décrites par Nellaiah et al., 1996. Les cellules sont récoltées après 40 h de culture par filtration. Elles sont suspendues dans un tampon Tris-HCl 10 mM de pH 7,1 (tampon A) contenant de la cystéine 1 mM, de l'EDTA 1 mM et du chlorure de phénylméthane sulfonyle (PMSF) 0,3 mM. Un extrait acellulaire est préparé par rupture du champignon en utilisant une presse de French, ou tout autre moyen utilisable par l'homme de l'art et une centrifugation à faible vitesse (1000 g) dans les conditions décrites par Nellaiah et al., 1996. Cet extrait est concentré à 100 mL par filtration à flux tangentiel avec une membrane ayant un seuil de coupure de 10, 40 ou jusqu'à 100 kDa. Toutes les autres manipulations sont conduites à une température de 4°C dans une solution tampon contenant de la cystéine 1 mM, de l'EDTA 1 mM et du PMSF 0,3 mM afin de prévenir l'inactivation de l'enzyme. La concentration de la protéine est déterminée par la méthode de Lowry et al., 1951, utilisant de l'albumine de sérum de bœuf comme témoin.

3) Purification de l'époxyde hydrolase

La solution concentrée contenant l'enzyme est déposée sur une colonne de DEAE (diéthylaminoéthyl)-Sephadex (2,5 cm x 30 cm) préalablement équilibrée avec le tampon A contenant du KCl 0,13 M. La colonne est lavée avec 360 mL de tampon d'équilibrage, et l'élution est conduite avec un gradient linéaire de KCl 0,13-0,23 M dans le tampon A (volume total : 510 mL, débit : 3 mL/min., volumes des fractions : 6 mL).

L'activité est éluée pour une concentration en chlorure de potassium de 0,17-0,20 M. Les fractions actives sont regroupées et concentrées à 5 mL par ultrafiltration. Le concentré est déposé sur une colonne de phényl-sephadex (1 cm x 10 cm), préalablement équilibrée avec le tampon A contenant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,25 M et 21 % (v/v) d'éthylène glycol. La colonne est lavée avec 10 mL du même tampon, et l'élution est conduite avec un gradient linéaire d'éthylène glycol 21-56 % (v/v) dans le tampon A contenant du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,25 M (volume total : 95 mL, débit : 0,5 mL/min., volumes des fractions : 1 mL).

L'activité est éluée avec une concentration d'éthylène glycol de 30-43 % (v/v). Les fractions actives sont regroupées et concentrées à 5 mL. Le concentré est déposé sur une colonne Mono Q (0,5 cm x 5 cm), préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl 10 mM pH : 6,5 contenant du KCl 0,13 M. La colonne est lavée avec 5 mL de tampon, et l'élution est conduite avec un gradient linéaire de chlorure de potassium 0,13-0,25 M (volume total : 85 mL, débit : 0,5 mL/min., volumes des fractions : 1 mL). L'activité est éluée à une concentration de 0,15-0,16 M de chlorure de potassium. Les fractions actives sont regroupées et concentrées à 1 mL. La solution contenant l'enzyme (200 mL) est déposée sur une colonne de Superose 12 (1 cm x 30 cm) et équilibrée avec un tampon A (débit : 0,3 mL/min., volumes des fractions : 0,6 mL). Cette étape est effectuée 5 fois (200 μL chaque fois) et toutes les fractions actives sont regroupées. La préparation ainsi obtenue est conservée à 4°C.

4) Etude enzymatique

Les incubations avec $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$ sont conduites dans des fioles de 1 mL contenant 180 μL de $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$ tampon B, 20 μL de l'époxyde hydrolase purifiée et 20 μL de substrat (50 mM dans l'acétonitrile). Après 1,5 h d'incubation à 25°C sous agitation magnétique (500 rpm) le substrat restant et le produit formé sont extraits avec 2 mL de

dichlorométhane. Le diol est purifié par chromatographie analytique sur silice (éluant diéthyléther). On analyse 2 μ L d'échantillons par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS). Le diol restant est transformé en l'acétonide correspondant par réaction avec du 2,2 diméthyl-propane en présence de l'acide p-toluène sulfonique.

5 L'acétonide est analysé par GC/MS tel que déjà décrit par Audier et al., 1968.

Une réaction dans un volume total de 5 mL est effectuée à 25°C, avec un substrat d'une concentration de 4,3 mM avec du DMSO (20% en volume) comme co-solvant dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 8.0.

La réaction est démarrée par addition de 13 U/L de l'enzyme purifiée. Des

10 échantillons sont retirés toutes les 30 minutes pour la quantification des concentrations du substrat et de produit par HPLC en utilisant une colonne en phase inverse (Nellaiah et al., 1996) et pour la quantification de l'excès énantiomérique de l'époxyde et du diol par chromatographie en phase gazeuse (Nellaiah et al., 1996).

15 5) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Une électrophorèse SDS-PAGE est effectuée sur une plaque de 1 mm d'épaisseur contenant un gel de résolution (10 % d'acrylamide) et un gel de concentration (4 % d'acrylamide) à pH 8,8 en présence de 0,1 % de dodecyl sulfate de sodium (SDS) (Laemmli, 1970). Les échantillons sont dissous dans un tampon Tris-HCl (62,5 mM,

20 pH 8,8) contenant 1 % (p/v) de SDS, 10 % (v/v) de glycérol et 2 % (v/v) de β -mercaptoéthanol, et sont chauffés à 100°C pendant 2 minutes. Les protéines sont colorées avec 0,1 % (p/v) de bleu de Coomassie. Des migrations sur gels PAGE non dénaturants sont effectuées de la même façon excepté qu'il n'y a pas eu de β -mercaptoéthanol rajouté dans le tampon de résolution, et que les échantillons n'ont pas

25 été chauffés. L'électrofocalisation est réalisée avec un gradient de pH de 3-9 à l'aide du système Pharmacia LKB "Phastsystem" et des procédures standards Pharmacia. Les protéines sont colorées avec du nitrate d'argent.

30 6) Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire a été estimée après SDS-PAGE par comparaison de la mobilité (Rf) de l'époxyde hydrolase (EH) purifiée avec celle des protéines témoins suivantes : phosphorylase B (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa),

ovalbumine (45 kDa), anhydrase carbonique (31 kDa), inhibiteur de la trypsine (21,5 kDa) et lysozyme (14,4 kDa). La masse moléculaire de l'enzyme native est estimée à partir du profil d'élution de Superose 12 par comparaison du K_{av} de l'EH purifiée avec celui des protéines standard suivantes: alcool déshydrogénase (150 kDa), sérum albumine bovine (67 kDa), ovalbumine (43 kDa), chymotrypsinogène A (25 kDa) et ribonucléase A (13,7 kDa). Le volume d'exclusion et le volume mort sont déterminés en utilisant du bleu dextrane et de la vitamine B12.

7) Séquence d'acides aminés

Pour les analyses d'acides aminés et les déterminations de séquence N-terminale, les peptides sont transférés des gels SDS sur une membrane "glassy-bond" (Biometra, Allemagne) en utilisant des procédures standard Biorad (Hercules, USA). La composition en acides aminés de l'enzyme est déterminée après hydrolyse acide (HCl 6N à 100°C sous vide pendant 24 h) en utilisant un analyseur automatique d'acides aminés (system Beckman 6300, Allemagne). La masse moléculaire est estimée à partir de la composition en acides aminés en utilisant la méthode de Delaage (1968).

8) Séquences des peptides

Les protéines sont dissoutes dans un tampon SDS et séparées par SDS-PAGE. Une partie du gel est colorée avec du Bleu de Coomassie, et la bande d'intérêt est séparée à partir de l'autre partie du gel. La bande est lavée pendant 1 h avec H₂O, H₂O-CH₃OH (90 : 10), H₂O-CH₃CN (80 : 20), et H₂O-CH₃CN (50 : 50). La bande de gel est ensuite coupée en petits morceaux et séchée sous vide dans un Speed-Vac (Savant). Ensuite, 400 µL d'une solution contenant Tris-HCl 25 mM (pH 8,5), EDTA 1 mM, 0,05 % SDS, et 5 µg de la protéase Lys-c (Boehringer Mannheim) sont ajoutés, et le mélange est incubé toute la nuit à 37°C. L'hydrolysate est injecté dans une colonne HPLC en phase inverse (Vydac C₁₈ ; 2,1 x 250 mm). La colonne est éluée à un débit de 0,2 mL/min avec un gradient linéaire de 0 à 35 % de la solution B (CH₃CN, contenant 0.07 % d'acide trifluoroacétique) pendant 150 min (la solution A est constituée d'eau et de 0,07 % d'acide trifluoroacétique) et les pics sont recueillis et directement séquencés avec un microséquenceur Applied Biosystems modèle 477A.

9) Réaction PCR, clonage et séquençage

Les réactions PCR sont réalisées en utilisant comme amorce des oligomères dégénérés obtenus à partir des séquences partielles d'acides aminés et en utilisant de l'ADN génomique d'*Aspergillus niger* en tant que support. L'ADN génomique est extrait de 1,5 g du mycélium lavé avec de l'eau, broyé dans de l'azote liquide et suspendu dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 50 mM, SDS 3 %, β -mercaptoéthanol 1 %. Après réaction pendant 1 h à 65 °C, la solution est extraite avec un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24/24/1, v/v/v) et chloroforme/alcool isoamylique (24/1), précipitée à l'isopropanol, et le culot est dissous dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 et EDTA 1 mM). On ajoute de la RNase (30 μ g/mL) pendant 1 h à 37 °C, l'ADN est précipité à l'isopropanol, lavé dans de l'éthanol 70 % et dissous dans de l'eau. Les réactions de PCR sont conduites dans un volume total de 50 μ L, en utilisant 100 ng d'ADN, dNTP 200 μ M, chaque amorce à 2 μ M et 2 unités de Taq polymérase (Perkin Elmer). Les réactions PCR sont effectuées par chauffage à 95°C pendant 5 min. puis réalisées pendant 30 cycles d'amplification à trois températures (1 min. à 95°C, 1 min. à 58°C, et 1 min. à 72°C). Les fragments amplifiés sont clonés dans le site ECOR V de pBluescript II SK(-) (Statagene) après traitement avec une unité/ μ L de transférase terminale (Boehringer). Le séquençage des fragments est réalisé à l'aide d'un kit de séquençage T7 de Pharmacia.

II) Résultats

L'EH d'*Aspergillus niger* est purifiée à homogénéité électrophorétique en utilisant une procédure chromatographique à 4 étapes. Au total, 120 μ g de l'enzyme purifiée sont préparés à partir de 24 g de mycélium sec, c'est-à-dire de 5 L de milieu de culture. Ces valeurs relativement faibles sont dues à 2 raisons :

1) le rendement d'ensemble (total) est faible (4 %) à cause de l'instabilité de l'enzyme durant la procédure de purification principalement dans les étapes de concentration par ultrafiltration lorsque la concentration de la protéine est faible ;

2) la teneur initiale de l'EH dans l'extrait cellulaire d'*Aspergillus niger* est faible: une valeur de 0,4 % des protéines solubles est calculée en utilisant l'activité spécifique de l'enzyme purifiée. Cependant, l'enzyme purifiée est responsable de toute l'activité du champignon sur pNSO. Ainsi, il n'y a probablement qu'une seule protéine active sur ce substrat dans *Aspergillus niger*.

L'époxyde hydrolase (EH) purifiée présente une seule bande en gel PAGE natif ou SDS après coloration avec le bleu de Coomassie. Les déterminations d'activité de tranches de gel obtenues après électrophorèse d'un gel de polyacrylamide non dénaturant révèlent une seule bande se situant au même niveau de la bande de la protéine marquée. Le point isoélectrique de la protéine est de 4,5 après détermination par électrofocalisation en utilisant un gradient de pH de 3 à 9 et une coloration au nitrate d'argent.

L'EH d'*Aspergillus niger* est un tétramère composé de 4 sous unités identiques de 45 kDa. Les EHs d'autres sources sont généralement des protéines monomériques ou dimériques. Cependant, l'époxyde hydrolase de *Corynebacterium* sp a récemment été décrite en tant que dodécamère (Misawa et al., 1998).

L'effet sur l'activité de plusieurs réactifs sélectifs a été testé. L'EDTA et le PMSF ne montrent aucun effet. Des agents oxydants tels que l'acide *méta*-chloroperbenzoïque ou le peroxyde d'hydrogène inhibent fortement l'activité de l'enzyme. Au contraire, des agents de réduction tels que le β -mercaptoéthanol ou la cystéine montrent un effet positif sur l'activité de l'enzyme. De plus, une forte inactivation est observée avec des agents bloquants des thiols tels que HgCl_2 , 4-hydroxy-mercuribenzoate, iodoacétamide ou dithionitrobenzène (DTNB). Tous ces résultats démontrent le rôle essentiel d'un ou plusieurs résidu(s) de cystéine sur l'activité de l'époxyde hydrolase. Un effet similaire est observé avec les EH solubles (sEH) de mammifères (Wixtrom et al., 1985) et avec l'EH de *Pseudomonas* sp (Rink et al., 1997) alors que les EH microsomaux (mEH) de mammifères (Wixtrom et al., 1985) ne sont pas sensibles aux réactifs de thiol.

Le profil d'activité pH et l'inhibition par l'acétophénone ω -bromo-4-nitro suggère la participation d'un résidu histidine dans le mécanisme catalytique. De plus, certains résidus cystéine sont importants pour l'activité de l'enzyme tel que démontré pour sEH de mammifères mais pas pour mEH (Wixtrom et al., 1985). Le mécanisme

5 catalytique des sEH et mEH de mammifères pour l'hydrolyse des époxydes a récemment été élucidé (Beetham et al., 1995 ; Arand et al., 1996). Un mécanisme en 2 étapes impliquant la formation d'un ester covalent intermédiaire a été démontré avec la participation de 2 acides aspartiques et un résidu histidine. Cependant, on ne connaît pas grand chose du mécanisme catalytique des EHs microbiennes. Récemment, un mécanisme similaire a été démontré pour l'époxyde hydrolase de la bactérie *Agrobacterium radiobacter* (Rink et al., 1997). Ces éléments suggèrent que l'EH d'*Aspergillus niger* utilise un mécanisme similaire pour l'hydratation des époxydes que les EHs de mammifères. Ce mécanisme est en accord avec le procédé général de catalyse démontré pour l'hydrolyse de l'oxyde de styrène para-substitué par un extrait brut d'*Aspergillus niger* (Pedragosa-Moreau et al., 1996).

10 Avec le pNSO, l'addition d'un solvant organique est requise pour la solubilisation du substrat. En effet, en l'absence de co-solvant, aucune activité ne peut être détectée. Il a été montré pour d'autres EHs solubles, qu'elles n'étaient pas actives sur des substrats micellaires (Hammock et al., 1997). Ainsi, l'effet de différents co-solvants sur l'activité de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* a été étudié. La nature des co-solvants influence grandement le rendement d'ouverture de l'époxyde, les plus fortes activités étant obtenues pour le DMF et l'acétone. La faible activité obtenue avec le THF pourrait être corrélée à l'inactivation de l'enzyme par les traces de peroxydes qui sont habituellement présentes dans le solvant.

20 L'enzyme est active à un pH allant de 5 à 9 avec un pic maximum à pH 7. L'enzyme est active à une température allant de 2 à 45°C avec une activité maximum à 40°C. De 2 à 40°C l'activité augmente légèrement (seulement 4 fois) tel qu'indiqué par la faible énergie d'activation (27 kJ.mol⁻¹. °K⁻¹).

25 D'un point de vue pratique, l'EH d'*Aspergillus niger* est très intéressante pour la synthèse organique pour sa capacité à hydrolyser des époxydes racémiques de façon hautement énantiosélective. L'énantiosélectivité est due à une plus forte affinité et une constante catalytique supérieure pour l'énantiomère (R) de pNSO par rapport à l'énantiomère (S).

30 Le rapport des constantes spécifiques (k_{cat}/K_m) indique que la vitesse initiale d'hydrolyse de l'énantiomère (R) est 55 fois plus rapide que celui de l'énantiomère (S) en partant du racémique pNSO. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec les

cellules entières sur le même substrat (Pedragosa-Moreau, 1997). De plus, la régiosélectivité de la réaction est très élevée: 97 % pour le carbone 2, tel que montré avec le champignon entier (Pedragosa-Moreau, 1996). L'énantio- et la régiosélectivité de l'hydrolyse de pNSO par l'EH purifiée d'*Aspergillus niger* sont très similaires à celles déterminées avec l'ensemble des cellules. Par conséquent, l'enzyme purifiée est responsable de toute l'activité du champignon sur pNSO.

B) Clonage et caractérisation de l'époxyde hydrolase soluble d'*Aspergillus niger* qui est apparentée aux époxydes hydrolase microsomales de mammifère

I) Procédure expérimentale

1) Isolement d'acides nucléiques d'*Aspergillus niger* (*A. niger*)

Aspergillus niger (souche n° LCP 521 susmentionnée) a été cultivée dans un milieu contenant 10 g de glucose et 20 g de liqueur de maïs (Sigma, St Louis, Cat. n° C4648) par litre de culture. L'incubation est réalisée dans un volume de 100 ml en fiole agitée à 28°C pendant 3 jours après inoculation avec des spores du champignon. Le mycélium est récolté par filtration sur tissu et gardé à -70°C après détermination du poids humide. L'extraction d'ARN est réalisée par la méthode de Chomczynski et Sacchi (1986) en utilisant 10 mL de solution dénaturante par gramme de mycélium. Le rendement typique est de 300 µg d'ARN total par gramme de mycélium. Pour l'isolement de l'ARN, 2 g de mycélium sont homogénéisés avec un homogénéiseur en verre de type Potter dans 15 mL d'une solution de lyse (solution de chlorhydrate de guanidine 6 M, contenant 0,1 M d'acétate de sodium, pH 5,5). Après centrifugation à 10,000 g pendant 10 min., le surnageant est transféré dans un autre tube et 2,5 volumes d'éthanol sont ajoutés. Les acides nucléiques précipités sont recueillis par centrifugation à 10,000 g pendant 10 min. et le culot résultant est dissous toute la nuit dans 10 mL de tampon de lyse après un bref séchage. La fraction insoluble est retirée par centrifugation et les acides nucléiques sont à nouveau précipités par addition de 25 mL d'éthanol. Le culot de centrifugation est lavé avec de l'éthanol 70 %, séché à l'air pendant 30 min. et dissous dans un tampon TE, pH 8.0.

2) Clonage du gène de l'EH d'*Aspergillus* et de l'ADNc via la technique de l'amplification en chaîne par polymérase (polymérase chain reaction : PCR)

La PCR inverse pour l'amplification du gène de l'EH *Aspergillus* a été réalisée selon le schéma suivant : 500 ng d'ADN génomique sont digérés avec une enzyme de restriction appropriée (la plupart des résultats réussis sont obtenus avec BamHI ou CfoI) et sont récupérés par une précipitation à l'éthanol après une extraction au mélange phénol/chloroforme. Sur ces 500 ng, 100 ng sont circularisés par ligation avec l'ADN ligase T4 (Life Technologies) dans un volume de 20 µL dans des conditions spécifiées par le fournisseur. Un microlitre de la préparation résultante est amplifié par PCR effectuée sur 30 cycles (1 min. 94°C, 1 min. 60°C, 3 min, 72°C) avec une ADN polymérase Taq (Perkin Elmer) dans des conditions de réaction standards recommandées par le fournisseur. Les amorces utilisées

(MA226 5'-ATGCGATCGGACTGCTGGACA-3' et

MA227 5'-CGCGGGCAATCCACACCTAC-3')

sont déduites de la séquence d'un fragment génomique obtenu précédemment. Un site de restriction XhoI situé entre les 2 sites d'amorçage dans la séquence génomique est utilisé facultativement pour relinéariser l'ADN circulaire avant la PCR inverse, afin de supprimer le stress de torsion et ainsi améliorer l'efficacité de l'amplification initiale du support génomique. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel agarose et les amplicons spécifiques de l'EH d'*Aspergillus* sont identifiés par immunotransfert selon la technique de Southern en utilisant le fragment génomique mentionné ci-dessus en tant que sonde. Les fragments de gène de l'EH *Aspergillus* identifiés de cette façon sont purifiés par électrophorèse sur gel agarose en utilisant le kit Quiaex (Qiagen), et clonés dans le vecteur pGEM-T (Promega) pour les analyses de séquence par la méthode de terminaison de chaîne.

A partir de l'information obtenue de la séquence, 2 amorces

(MA290 5'-cggaattccATGgTCACTGGAGGAGCAATAATTAG-3' et

MA291 5'-ttgaatTCCCTACTTCTGCCACAC-3'; les résidus en lettres capitales

sont complémentaires de la séquence support) entourant la région codant la protéine du gène EH sont déduits et utilisés pour amplifier les fragments respectifs de l'ADN génomique et transcrire en inverse l'ARNm avec l'ADN polymérase Pfu de haute

fidélité ("Stratagene") sur 40 cycles (1 min. 94°C, 1 min. 50°C, 6 min. 72°C). Les fragments ADN résultant sont digérés avec EcoRI et insérés dans pUC19 (New England Biolabs) pour l'analyse séquentielle finale.

5 3) Expression, purification et analyse de l'époxyde hydrolase recombinante

Pour l'expression recombinante dans *E. coli*, le fragment ADNc de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* est amplifié avec une ADN polymérase Pfu en utilisant l'amorce MA291 (voir ci-dessus) et l'amorce MA318

(5'gctgaattcacATGTCCGCTCCGTTCGCCAAG-3')

10 afin d'introduire un site de reconnaissance AfIII NcoI-compatible (souligné dans le primer MA318) dans le codon d'initiation probable du gène de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* qui a été révélé par l'analyse des séquences.

Le vecteur d'expression pGEF+ de bactérie, est modifié en introduisant un site multiple de coupure

15 (5'-CCATGGGAATTCTCGAGATCTAAGCTTATGCATCAGCTGCATGG-3')

20 dans le site NcoI qui contient le codon de départ du vecteur pGEF+ dans le contexte adapté à un site de liaison du ribosome, en aval du promoteur de l'ARN polymérase T7. Le plasmide résultant est appelé pGEF II dans ce qui suit. Le fragment PCR AfIII/Eco RI de l'EH d'*Aspergillus* est ligaturé dans le site NcoI/Eco RI de pGEF II pour produire la construction d'expression pGEF Asp EH". La souche *E. coli* BL21 (DE 3) (Novagen) est transformée avec pGEF Asp EH et mise dans le milieu LB à 30°C. En phase exponentielle tardive, l'induction de l'expression de la protéine recombinante est réalisée par addition d'isopropyl-β-thiogalactoside (100 μM). Après deux heures, les bactéries sont recueillies par centrifugation, resuspendues dans 0,02 volumes de culture du tampon STE (Tris-HCl, 10 mM, chlorure de sodium, 100 mM, acide éthylènediamine tétraacétique, 1 mM, pH 7,4) et stockées à -70°C. L'activité enzymatique est déterminée par transformation de l'énantiomère R de l'oxyde de *para*-nitrostyrène en diol correspondant. La réaction est conduite à une concentration de substrat de 880 μM dans 500 μL STE à 37°C pendant 30 min., en présence de 10 μL d'acétonitrile qui est utilisé comme solvant de l'oxyde de *para*-nitrostyrène.

La réaction de conversion est terminée par extraction du substrat avec un

volume égal de chloroforme. Dans ces conditions, plus de 99,9 % du substrat est extrait dans la phase organique et 60 % du diol est retrouvé dans la phase aqueuse.

Le substrat de conversion est quantifié par addition de 400 μL de surnageant à 800 μL d'eau et en lisant la densité optique à 277 nm, avec le coefficient d'extinction molaire du produit étant $9,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* est purifiée jusqu'à homogénéité par une procédure en 3 étapes, selon la méthode décrite ci-dessus.

Les anticorps dirigés contre la protéine purifiée ont été obtenus en immunisant des lapins selon la technique décrite par Friedberg et al., 1991. La protéine purifiée est analysée par électrophorèse sur gel polyacrylamide SDS suivi par un marquage au bleu Coomassie ou par immunotransfert selon les procédures précédemment publiées.

4) Construction et analyse des mutants d'époxyde hydrolase

Une mutagenèse dirigée contrôlée par PCR de l'ADNc d'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* est conduite par la méthode de Tomic et al., 1990, tel que décrit précédemment pour les époxydes hydrolases solubles de mammifères et les époxydes hydrolases microsomaux (Arand et al., 1996; Arand et al., 1999).

Des amorces ont été utilisées pour l'introduction des différentes mutations. Les mutations affectant le nucléophile catalytique Asp¹⁹² sont introduites en échangeant la cassette interne NcoI de l'ADNc de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* contre le fragment PCR-modifié.

De même, des mutations ciblant les résidus du système de relais de charge, à savoir Asp³⁴⁸ et His³⁷⁴, sont introduites en substituant un fragment XhoI avec le fragment respectif PCR. Les modifications PCR sont générées en utilisant la polymérase ADN Pfu afin de minimiser l'introduction de modifications de séquence non voulues. Tous les fragments PCR-générés sont finalement séquencés pour s'assurer de leur exactitude. Après expression recombinante, la solubilité des protéines mutantes est testée, ce qui représente un indicateur de leur intégrité structurelle. Après sonication des culots bactériens, la suspension résultante est centrifugée à 10,000 g, le culot et le surnageant sont contrôlés pour la présence de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* par immunotransfert. L'activité enzymatique est contrôlée dans le surnageant tel que décrit précédemment.

II) Résultats

L'isolement du gène de l'époxyde hydrolase (EH) d'*Aspergillus* et l'ADNc via une PCR inverse, ont été obtenus. Il a été difficile d'obtenir des fragments amplifiés spécifiques en utilisant des enzymes de restriction avec des sites de reconnaissance hexamérique pour la digestion de l'ADN génomique.

Ceci semble dû à deux erreurs d'appariement dans l'amorce MA226, par comparaison à la séquence d'origine naturelle, qui affaiblit l'amplification des produits longs, mais ne pose pas de problème quand on utilise les enzymes de restriction avec des séquences de reconnaissance tétramériques. Cependant, le premier fragment obtenu après une restriction par BamHI de l'ADN semble être artificiellement tronqué, ce qui est une conséquence de l'amorçage interne de l'amplicon initial. Par conséquent, la région 3' de l'EH d'*Aspergillus* en aval de la séquence génomique est manquante dans ce fragment et doit être obtenue séparément dans une seconde expérience PCR inverse.

L'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* est clairement reliée aux mEHs des mammifères, bien que cette enzyme soit unique sous plusieurs aspects.

Premièrement, c'est une enzyme soluble n'ayant pas de séquence d'ancrage dans la membrane, contrairement aux époxydes hydrolases microsomaux de mammifères (mEHs), et leurs correspondants chez les arthropodes.

Deuxièmement, l'EH d'*Aspergillus* a un pouvoir de conversion beaucoup plus élevé avec l'oxyde de *para*-nitrostyrène, que ceux des époxydes hydrolases de mammifères avec leurs substrats.

Alors que l'époxyde hydrolase microsomale (mEH) de rat a une activité spécifique avec ses substrats modèles oxyde de styrène et oxyde de benzo[α]pyrène d'environ 500 nmoles converties par minute et milligramme d'enzyme pure, l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* hydrolyse 100 μ mol d'oxyde de styrène 4-nitro par minute et milligramme d'enzyme. Le nombre de conversion de mEH de rat a été augmenté par un facteur de 30 en substituant le résidu acide du système de relais de charge de son site catalytique, à savoir Glu⁴⁰⁴, par l'acide aspartique. De façon intéressante, le résidu correspondant dans l'époxyde hydrolase native *Aspergillus* est déjà un acide aspartique, par opposition au fait que l'acide glutamique occupe cette position dans toutes les autres enzymes mEH. La substitution de Asp³⁴⁸ catalytique dans l'époxyde

hydrolase d'*Aspergillus* par Glu conduit à une chute modérée du V_{\max} d'un facteur de seulement 2. Dans le même temps, le K_M a chuté d'un facteur de 3. Une possible explication de cette observation pourrait être celle d'une inversion dans l'étape limitant le taux de conversion de la réaction enzymatique. Dans les mEH et sEH de mammifères la seconde étape hydrolytique de la réaction enzymatique semble être une étape limitant le taux de conversion. Dans de telles conditions, c'est à dire lorsque la constante de vitesse de la formation de l'ester intermédiaire k_1 est beaucoup plus important que la constante k_2 pour l'étape hydrolytique, la réduction de V_{\max} due à un k_2 réduit se fait en parallèle d'une réduction similaire de K_M , parce que $K_M = K_D k_2 / (k_1 + k_2)$. Cependant, si, initialement k_1 limite le taux, et k_2 est beaucoup plus important, l'expression $k_2 / (k_1 + k_2)$ sera approximativement égale à 1 et K_M est égal à K_D . Une réduction de V_{\max} de moitié due à une modulation du système de relais de charge, c'est-à-dire de la partie importante du site catalytique pour la deuxième étape de la réaction enzymatique, est probablement due à une forte diminution de k_2 allant jusqu'à la moitié de la valeur de k_1 . En conséquence, $k_2 / (k_1 + k_2)$ serait maintenant proche de 1/3, c'est-à-dire exactement la valeur observée pour le mutant Asp³⁴⁸Glu de l'époxyde hydrolase (EH) d'*Aspergillus*. Ainsi, ces résultats sont compatibles avec le fait que dans le cas de EH d'*Aspergillus* avec l'oxyde de *para*-nitrostyrène comme substrat, k_2 est plus grand que k_1 , une situation qui n'existe plus lors de la substitution de Asp³⁴⁸ par Glu. Ceci correspondrait exactement au scénario observé avec les mEH de mammifères.

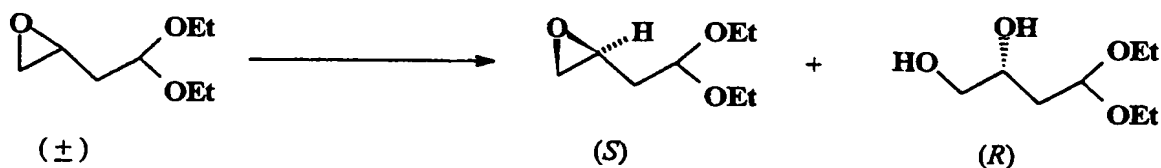
La structure du gène de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus* est très complexe, si on se base sur la simplicité de l'organisme d'origine. Alors que la taille moyenne des introns identifiés est d'environ 60 pb, et donc est en accord avec celle de beaucoup d'autres gènes d'*Aspergillus*, par contre, le nombre d'introns dans le gène *Aspergillus*, 8 en tout, est anormalement élevé.

Aucun des exons/introns n'est conservé entre champignons et mammifères, en dépit du nombre identique d'introns dans les 2 organismes. Les gènes de champignon et de mammifère ont tous les deux un premier exon non-codant. Chez le rat, l'existence d'au moins 3 alternatives pour le premier exon a été notée. Ici, le premier exon non-codant permet l'usage alternatif de différents promoteurs pour la synthèse de protéines identiques.

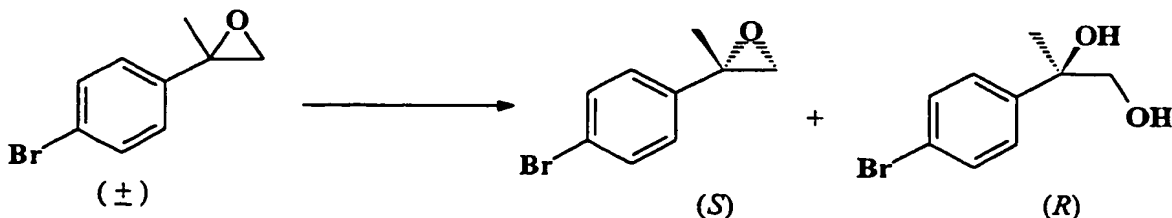
C) exemples d'application

Exemple 1

15g d'Oxyde de 1,1-diéthoxybut-3-ène (94 mmoles soit une concentration de 0,3
 5 mole par litre de milieu réactionnel) sont ajoutés à 300 ml de tampon phosphate (pH
 8, 0.1M). La température est amenée à 4°C et 1.2g d'enzyme purifiée (native) sont
 additionnés. Après 30 heures d'agitation à 4°C l'époxyde résiduel est extrait avec du
 pentane. L'évaporation du solvant suivie d'une distillation permet d'isoler 4.5g de (S)-
 époxyde (Rdt = 30%, ee = 98%). Une extraction en continu de la phase aqueuse
 10 avec du dichlorométhane permet d'isoler après purification sur une colonne de silice
 9g de (R)-diol (Rdt = 54%, ee = 47%).

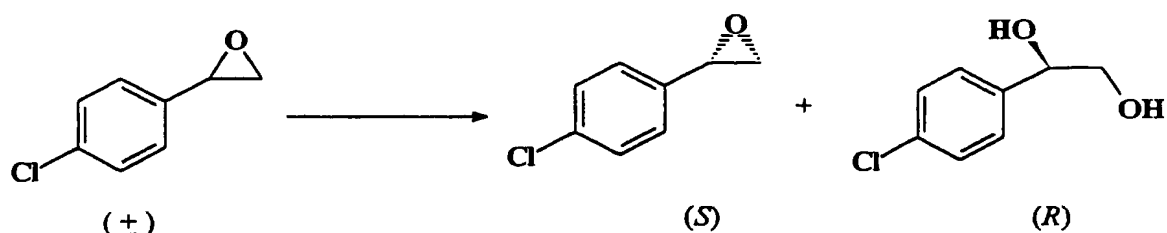
Exemple 2

6g de *para*-Bromo- α -méthylstyrène oxyde (28 mmoles soit une concentration de
 0,35 mole par litre de milieu réactionnel) sont ajoutés à 75 ml de tampon phosphate
 (pH 8, 0.1M). La température est amenée à 4°C et 0.35g d'enzyme purifiée (native)
 sont additionnés. Après 8 jours d'agitation à 0°C l'époxyde résiduel est extrait avec
 20 du pentane. L'évaporation du solvant suivie d'une distillation permet d'isoler 2.3g de
 (S)-époxyde (Rdt = 39%, ee = 99.7%). Une extraction en continu de la phase
 aqueuse avec du dichlorométhane permet d'isoler après purification sur une colonne
 de silice 3.19g de (R)-diol (Rdt = 49%, ee = 96%).

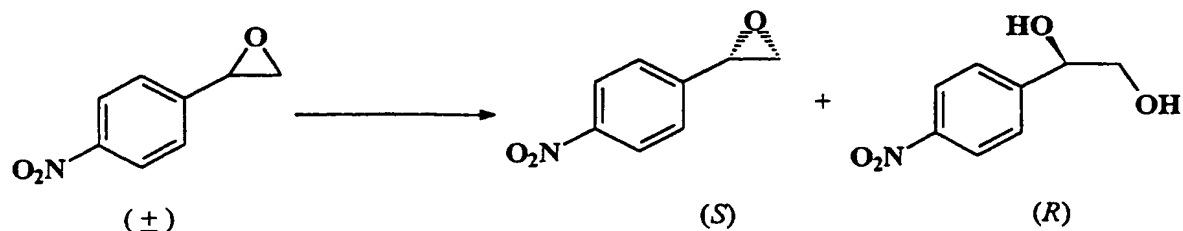


Exemple 3

4g de *para*-Chlorostyrène oxyde (26 mmoles soit une concentration de 2 moles par litre de milieu réactionnel) sont ajoutés à 9 ml de tampon phosphate (pH 7, 0.1M). La température est amenée à 0°C et 2.3g d'enzyme purifiée (native) sont additionnés. Après 8 heures d'agitation à 0°C l'époxyde résiduel est extrait avec du pentane. L'évaporation du solvant suivie d'une distillation permet d'isoler 1.9g de (*S*)-époxyde (Rdt = 47%, ee = 99%). Une extraction de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle permet d'isoler après purification sur une colonne de silice 2.15g de (*R*)-diol (Rdt = 48%, ee = 92%).

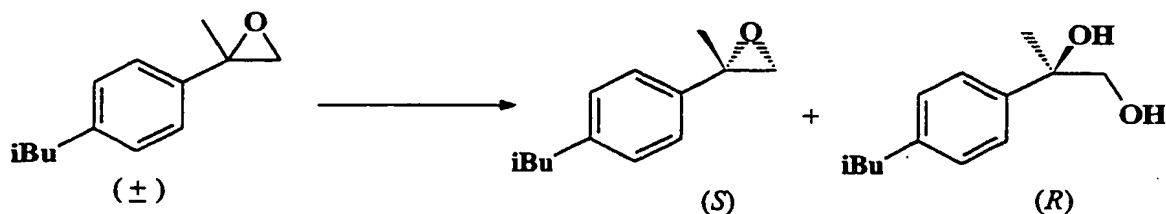
Exemple 4

4g de *para*-Nitrostyrène oxyde (24 mmoles soit une concentration de 0,3 mole par litre de milieu réactionnel) dissous dans 15 ml de DMSO sont ajoutés à 60 ml de tampon phosphate (pH 7, 0.1M). La température est amenée à 27°C et 0.7g d'enzyme purifiée (native) sont additionnés. Après 32 heures d'agitation le milieu réactionnel est saturé avec du NaCl puis extrait en continu avec du dichlorométhane. L'évaporation du solvant suivie d'une chromatographie sur silice permet d'isoler 1.8g de (*S*)-époxyde (Rdt = 45%, ee = 96%) et 2.3g de (*R*)-diol (Rdt = 52%, ee = 86%).

Exemple 5

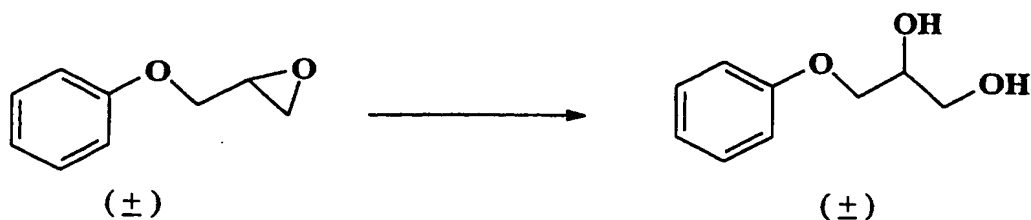
1.5g de *para*-isobutyl- α -méthylstyrene oxyde (7,9 mmoles soit une concentration de 0,25 mole par litre de milieu réactionnel) sont ajoutés à 30 ml de tampon tris (pH 8, 0.4M). La température est amenée à 4°C et 2.6g d'enzyme

purifiée (native) sont additionnés. Après 24 jours d'agitation à 4°C l'époxyde résiduel est extrait avec du pentane. L'évaporation du solvant suivie permet d'obtenir le (*S*)-époxyde (ee = 96%) non purifié. Une extraction de la phase aqueuse avec de l'éther permet d'isoler après purification sur une colonne de silice 0.91g de (*R*)-diol (Rdt = 55%, ee = 70%).



Exemple 6

1g de phényl glycidyl éther (6,7 mmoles soit une concentration de 3,3 moles par litre de milieu réactionnel) est ajouté à 1 ml de tampon phosphate (pH 7, 0.1M). La température est amenée à 27°C et 25 mg d'enzyme recombinante purifiée sont additionnés. Après 15 heures d'agitation à 27°C la totalité de l'époxyde est transformé en diol correspondant racémique. Une extraction avec de l'acétate d'éthyle permet d'isoler ce diol avec un rendement quantitatif.



BIBLIOGRAPHIE

- Audier H.E., Dupin J.F., Jullien J. (1968) *Bull. Chem. Soc.*, **9**, 3844-3847.
- 5 - Arand M., Wagner H., Oesch F. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 4223-4229
- Arand M., Müller F., Mecky A., Hinz W., Urban P., Pompon D., Kellner R.,
Oesch F. (1999) *Biochem. J.*, **337**, 37-43
- 10 - Archelas A., Furstoss R. (1997) *Ann. Rev. Microbiol.*, **51**, 491-525
- Archelas A., Furstoss R. (1998) *Trends in Biotechnology*, **16**, 108-116
- Beetham J. K., Grant D., Arand M., Garbarino J., Kiyosue T., Pinot F., Oesch F.,
15 Belknap W. R., shinozaki K., Hammock B. D. (1995) *DNA Cell Biol.*, **14**, 67-71
- Blée E., Schuber F. (1992) *Biochem. J.*, **282**, 711-714
- Borhan B., Jones A. D., Pinot F., Grant D. F., Kurth M. J., Hammock B. D.
20 (1995) *Anal. Biochem.*, **231**, 188-200
- Chomczynski P., Sacchi N. (1986) *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159
- Dansette P.M., Makedonska V.B., Jerina D.M. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*
25 **187**, 290-298
- Delaage M. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 443-445.
- Friedberg T., Kissel W., Arand M., Oesch F. (1991) In *Methods in Enzymology*
30 (Waterman M. R. and Johnson E. F., eds) Vol. 206, pp. 193-201, Academic Press,
New York
- Hammock B. D., Grant D. F., Storms D. H. (1997) In *Comprehensive Toxicology* (Sipes,
I., McQueen C. and Gandolfi, A., Eds), pp 283-305, Pergamon Press, Oxford
35
- Laemmli U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685
- Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*,
40 **193**, 265-275
- Misawa E., Chan Kwo Chion C. K. C., Archer I. W., Woodland M. P., Zhou N. Y.,
Carter S., Widdowson D. A., Leak D. A. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **253**, 173-183
- Nellaiah H., Morisseau C., Archelas A., Furstoss R., Baratti J. C. (1996) *Biotech.*
45 *Bioeng.*, **49**, 70-77
- Pedragosa-Moreau S., Archelas A., Furstoss R. (1993) *J. Org. Chem.* **58**, 5533-5536

- Pedragosa-Moreau S., Archelas A., Furstoss R. (1995) *Bull. Soc. Chim. Fr.* **132**, 769-800
- Pedragosa-Moreau S., Archelas A., Furstoss R. (1996) *J. Org. Chem.*, **61**, 7402-7407
- 5 - Pedragosa-Moreau S., Morisseau C., Zylber J., Baratti J.C., Archelas A., Furstoss R. *Tetrahedron* (1997) **53**, 9707-9714
- Rink R., Fennema M., Smids M., Dehmelt U., Janssen D. B. (1997) *J. Biol. Chem.*,
10 **272**, 14650-14657
- Schurig V., Betschinger F. (1992) *Chem. Rev.* 873-888
- Tomic M., Sunjeravic I., Savtchenko E.S., Blumenberg M. (1990) *Nucleic Acids*
15 *Res.*, **18**, 1656
- Touhara K., Prestwich G. D. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 19604-19609
- Westkaemper R.B., Hanzlik R.P. (1980) *Anal. Biochem.*, **102**, 63-67
- 20 - Westkaemper R.B., Hanzlik R.P. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 195-204
- Wixtrom R.N., Hammock B.D. (1985) In *Biochemical Pharmacology and Toxicology*
(Zakim D. and Vessey D.A., Eds) pp. 1-93, John Willey & Sons, New-York.
- 25

- 29 -

LISTE DE SEQUENCES

<110> C.N.R.S.

5 <120> PROTEINES D'ORIGINE FONGIQUE ET DERIVEES, LEURS
 PROCEDES D'OBTENTION, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT
 POUR LA PREPARATION DE MOLECULES ENANTIOMERIQUEMENT
 PURES

10 <130> EPOXSL

<140>

<141>

15 <160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1197

<212> ADN

<213> Aspergillus niger

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(1197)

Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1

<400> 1

30	atg tcc gct ccg ttc gcc aag ttt ccc tcg tcg gcg agc att tcg cct	48
	Met Ser Ala Pro Phe Ala Lys Phe Pro Ser Ser Ala Ser Ile Ser Pro	
	1 5 10 15	
35	aat cct ttc acg gtc tct atc ccg gat gaa cag ttg gat gac ttg aaa	96
	Asn Pro Phe Thr Val Ser Ile Pro Asp Glu Gln Leu Asp Asp Leu Lys	
	20 25 30	
40	acc ctc gtc cga ctg tcc aag att gct cct ccc acc tat gag agc ctg	144
	Thr Leu Val Arg Leu Ser Lys Ile Ala Pro Pro Thr Tyr Glu Ser Leu	
	35 40 45	
45	caa gcg gat ggc cgg ttt ggc atc act tct gaa tgg ctg aca act atg	192
	Gln Ala Asp Gly Arg Phe Gly Ile Thr Ser Glu Trp Leu Thr Thr Met	
	50 55 60	
50	cgg gag aaa tgg ctc tcg gag ttt gac tgg cga cca ttt gaa gct cga	240
	Arg Glu Lys Trp Leu Ser Glu Phe Asp Trp Arg Pro Phe Glu Ala Arg	
	65 70 75 80	
55	ctg aac tct ttc cct cag ttt act aca gag atc gag ggt ctc acg att	288
	Leu Asn Ser Phe Pro Gln Phe Thr Thr Glu Ile Glu Gly Leu Thr Ile	
	85 90 95	
60	cac ttt gct gct ctc ttc tcc gag agg gag gat gct gtg cct atc gca	336
	His Phe Ala Ala Leu Phe Ser Glu Arg Glu Asp Ala Val Pro Ile Ala	
	100 105 110	
65	ttg ctc cat ggt tgg ccc ggc agc ttc gtt gag ttc tac cca atc ctg	384
	Leu Leu His Gly Trp Pro Gly Ser Phe Val Glu Phe Tyr Pro Ile Leu	
	115 120 125	

- 30 -

5	cag cta ttc cgg gag gag tac acc cct gag act ctg cca ttc cat ctg	432
	Gln Leu Phe Arg Glu Glu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Pro Phe His Leu	
	130 135 140	
10	gtt gtt ccg tcc ctt cct ggg tat act ttt tca tct ggt ccc ccg ctg	480
	Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Gly Pro Pro Leu	
	145 150 155 160	
15	gac aag gac ttc ggc ttg atg gac aac gcc cgg gtc gta gac cag ttg	528
	Asp Lys Asp Phe Gly Leu Met Asp Asn Ala Arg Val Val Asp Gln Leu	
	165 170 175	
20	atg aag gac ctc ggg ttc gga agt ggt tat att att cag gga ggt gat	576
	Met Lys Asp Leu Gly Phe Gly Ser Gly Tyr Ile Ile Gln Gly Gly Asp	
	180 185 190	
25	att ggt agc ttt gtt gga cga ctg ttg ggc gtg ggt ttc gac gcc tgc	624
	Ile Gly Ser Phe Val Gly Arg Leu Leu Gly Val Gly Phe Asp Ala Cys	
	195 200 205	
30	aaa gcg gtt cat ttg aac ctg tgc gca atg agg gct ccc cct gag ggc	672
	Lys Ala Val His Leu Asn Leu Cys Ala Met Arg Ala Pro Pro Glu Gly	
	210 215 220	
35	ccg tca att gag agc ttg tcc gca gcg gag aag gag gga atc gcg cga	720
	Pro Ser Ile Glu Ser Leu Ser Ala Ala Glu Lys Glu Gly Ile Ala Arg	
	225 230 235 240	
40	atg gag aag ttc atg acc gat ggc tta gct tat gcc atg gag cac agt	768
	Met Glu Lys Phe Met Thr Asp Gly Leu Ala Tyr Ala Met Glu His Ser	
	245 250 255	
45	act cgg ccc agt act att ggc cac gtg ctg tcc agc agt ccg atc gca	816
	Thr Arg Pro Ser Thr Ile Gly His Val Leu Ser Ser Ser Pro Ile Ala	
	260 265 270	
50	tta ctt gca tgg att ggt gag aaa tat ctc caa tgg gtg gat aaa ccc	864
	Leu Leu Ala Trp Ile Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Trp Val Asp Lys Pro	
	275 280 285	
55	ctc cct tct gag acc atc ctc gag atg gtg agc ctg tat tgg ctg acg	912
	Leu Pro Ser Glu Thr Ile Leu Glu Met Val Ser Leu Tyr Trp Leu Thr	
	290 295 300	
60	gaa agt ttc ccg cgg gca att cat acc tac cgc gag act acc cca act	960
	Glu Ser Phe Pro Arg Ala Ile His Thr Tyr Arg Glu Thr Thr Pro Thr	
	305 310 315 320	
65	gcc tcc gct ccc aat gga gcg aca atg ctt cag aag gaa tta tat att	1008
	Ala Ser Ala Pro Asn Gly Ala Thr Met Leu Gln Lys Glu Leu Tyr Ile	
	325 330 335	
70	cac aag ccg ttt ggg ttc tcc ttc ttc ccc aag gac ctt tgt cct gtg	1056
	His Lys Pro Phe Gly Phe Ser Phe Phe Pro Lys Asp Leu Cys Pro Val	
	340 345 350	
75	cct cgg agc tgg att gct aca acg gga aat cta gta ttc ttc cgg gat	1104
	Pro Arg Ser Trp Ile Ala Thr Thr Gly Asn Leu Val Phe Phe Arg Asp	
	355 360 365	

- 31 -

cat gca gag gga gga cac ttt gcc gca ttg gag cgt cca cgc gag ctg 1152
 His Ala Glu Gly Gly His Phe Ala Ala Leu Glu Arg Pro Arg Glu Leu
 370 375 380

5 aag acc gac ctg aca gca ttt gtc gag cag gtg tgg cag aag tag 1197
 Lys Thr Asp Leu Thr Ala Phe Val Glu Gln Val Trp Gln Lys
 385 390 395

10 Séquence peptidique SEQ ID NO : 2
 <210> 2
 <211> 399
 <212>
 <213> Aspergillus niger

15 <400> 2
 Met Ser Ala Pro Phe Ala Lys Phe Pro Ser Ser Ala Ser Ile Ser Pro
 1 5 10 15

20 Asn Pro Phe Thr Val Ser Ile Pro Asp Glu Gln Leu Asp Asp Leu Lys
 20 25 30

Thr Leu Val Arg Leu Ser Lys Ile Ala Pro Pro Thr Tyr Glu Ser Leu
 35 40 45

25 Gln Ala Asp Gly Arg Phe Gly Ile Thr Ser Glu Trp Leu Thr Thr Met
 50 55 60

30 Arg Glu Lys Trp Leu Ser Glu Phe Asp Trp Arg Pro Phe Glu Ala Arg
 65 70 75 80

Leu Asn Ser Phe Pro Gln Phe Thr Thr Glu Ile Glu Gly Leu Thr Ile
 85 90 95

35 His Phe Ala Ala Leu Phe Ser Glu Arg Glu Asp Ala Val Pro Ile Ala
 100 105 110

Leu Leu His Gly Trp Pro Gly Ser Phe Val Glu Phe Tyr Pro Ile Leu
 115 120 125

40 Gln Leu Phe Arg Glu Glu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Pro Phe His Leu
 130 135 140

Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Gly Pro Pro Leu
 45 145 150 155 160

Asp Lys Asp Phe Gly Leu Met Asp Asn Ala Arg Val Val Asp Gln Leu
 165 170 175

50 Met Lys Asp Leu Gly Phe Gly Ser Gly Tyr Ile Ile Gln Gly Gly Asp
 180 185 190

Ile Gly Ser Phe Val Gly Arg Leu Leu Gly Val Gly Phe Asp Ala Cys
 195 200 205

55 Lys Ala Val His Leu Asn Leu Cys Ala Met Arg Ala Pro Pro Glu Gly
 210 215 220

Pro Ser Ile Glu Ser Leu Ser Ala Ala Glu Lys Glu Gly Ile Ala Arg
 60 225 230 235 240

- 32 -

Met Glu Lys Phe Met Thr Asp Gly Leu Ala Tyr Ala Met Glu His Ser
 245 250 255
 5 Thr Arg Pro Ser Thr Ile Gly His Val Leu Ser Ser Ser Pro Ile Ala
 260 265 270
 Leu Leu Ala Trp Ile Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Trp Val Asp Lys Pro
 275 280 285
 10 Leu Pro Ser Glu Thr Ile Leu Glu Met Val Ser Leu Tyr Trp Leu Thr
 290 295 300
 Glu Ser Phe Pro Arg Ala Ile His Thr Tyr Arg Glu Thr Thr Pro Thr
 15 305 310 315 320
 Ala Ser Ala Pro Asn Gly Ala Thr Met Leu Gln Lys Glu Leu Tyr Ile
 325 330 335
 20 His Lys Pro Phe Gly Phe Ser Phe Phe Pro Lys Asp Leu Cys Pro Val
 340 345 350
 Pro Arg Ser Trp Ile Ala Thr Thr Gly Asn Leu Val Phe Phe Arg Asp
 355 360 365
 25 His Ala Glu Gly Gly His Phe Ala Ala Leu Glu Arg Pro Arg Glu Leu
 370 375 380
 Lys Thr Asp Leu Thr Ala Phe Val Glu Gln Val Trp Gln Lys
 30 385 390 395

35

REVENDICATIONS

1. Protéine d'origine fongique ayant une activité époxyde hydrolase, telle
qu'obtenue sous forme essentiellement pure par extraction à partir de cellules de
champignons, ou par mise en culture de cellules hôtes transformées par une
séquence nucléotidique codant pour la protéine fongique susmentionnée, ou
protéine dérivée par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs
acides aminés de la protéine d'origine fongique susmentionnée et possédant une
activité époxyde hydrolase.

2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence SEQ ID NO : 2,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2, notamment
par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, et
possédant une activité époxyde hydrolase, ladite séquence dérivée ayant de
préférence une homologie d'au moins environ 40 % avec la séquence SEQ ID
NO : 2,
- ou tout fragment de la séquence SEQ ID NO : 2, ou d'une séquence
dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, et possédant une activité
époxyde hydrolase, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins
environ 10 acides aminés contigus dans la région délimitée par les acides aminés
situés aux positions 1 et 339 de la séquence SEQ ID NO : 2.

3. Protéine selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle
correspond à une époxyde hydrolase fongique sous forme essentiellement pure,
telle qu'obtenue par extraction et purification à partir de cultures de cellules de
champignons de l'espèce *Aspergillus*.

4. Protéine selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle
correspond à l'époxyde hydrolase fongique sous forme essentiellement pure
représentée par SEQ ID NO : 2, telle qu'obtenue par extraction et purification à

partir de cultures de cellules de souches d'*Aspergillus niger* ou d'*Aspergillus turingensis*.

5 5. Protéine selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle correspond à une époxyde hydrolase fongique recombinante, telle qu'obtenue sous forme essentiellement pure par transformation de cellules hôtes appropriées à l'aide de vecteurs contenant :

10 - la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2, ou toute séquence dérivée de SEQ ID NO : 1 par dégénérescence du code génétique, et codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2,

15 - ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 1, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 45 % avec la séquence SEQ ID NO : 1,

20 - ou tout fragment de la séquence SEQ ID NO : 1, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, et codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 20 nucléotides contigus dans la région délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 1197 de la séquence SEQ ID NO : 1.

25 6. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle correspond à l'époxyde hydrolase fongique recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, telle qu'obtenue par transformation de cellules hôtes appropriées à l'aide de vecteurs contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1, ou toute séquence dérivée de SEQ ID NO : 1 par dégénérescence du code génétique, et codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2.

30 7. Séquence nucléotidique codant une protéine d'origine fongique à activité époxyde hydrolase telle que définie l'une des revendications 1 à 6.

- 35 -

8. Séquence nucléotidique selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence représentée par SEQ ID NO : 1 codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2,

5 - ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 1 par dégénérescence du code génétique, et codant l'époxyde hydrolase représentée par SEQ ID NO : 2,

10 - ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 1, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 45 % avec la séquence SEQ ID NO : 1,

15 - ou tout fragment de la séquence SEQ ID NO : 1, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, et codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 20 nucléotides contigus dans la région délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 1197 de la séquence SEQ ID NO : 1,

- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

20 - ou toute séquence nucléotidique codant une enzyme possédant une activité époxyde hydrolase, et susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments susmentionnés,

les séquences ou fragments susmentionnés étant sous forme simple brin ou double brin.

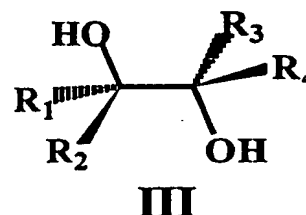
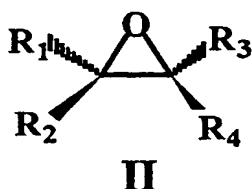
25 9. Vecteur, notamment plasmide, contenant une séquence nucléotidique selon la revendication 7 ou 8.

30 10. Cellule hôte, choisie notamment parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, ladite cellule hôte étant transformée, notamment à l'aide d'un vecteur selon la

revendication 9, de manière à ce que son génome contienne contenant une séquence nucléotidique selon la revendication 7 ou 8.

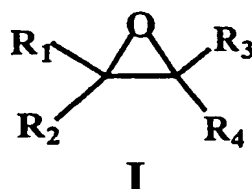
11. Utilisation de protéines protéine à activité époxyde hydrolase définies dans l'une des revendications 1 à 6, en tant que biocatalyseurs enzymatiques dans le cadre de la mise en œuvre de procédés de préparation d'époxydes ou de diols vicinaux énantiomériquement purs, notamment dans le domaine pharmaceutique, phytosanitaire, ou dans le cadre de la fabrication de matériaux optiques spécifiques.

12. Procédé de préparation d'époxydes et/ou de diols énantiomériquement purs respectivement de formules (II) et (III) suivantes



dans lesquelles R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent des groupes quelconques, notamment des groupes caractéristiques des composés pharmaceutiques, phytosanitaires, ou des matériaux optiques spécifiques correspondant auxdits époxydes ou diols vicinaux,

ledit procédé comprenant une étape de traitement d'un mélange d'époxydes diastéréoisomères, ou d'un époxyde chiral sous forme racémique, ou d'un époxyde prochiral de formule (I) suivante :



avec une protéine à activité époxyde hydrolase selon l'une des revendications 1 à 6, ou avec des cellules hôtes selon la revendication 10 exprimant une protéine à activité époxyde hydrolase selon l'une des revendications 1 à 6, ce qui conduit à l'obtention :

- 5 - d'un mélange des composés de formule (II) et (III) susmentionnés, lesdits composés de formule (II) et (III) pouvant, le cas échéant, être séparés par une étape supplémentaire de purification,
- ou du seul composé de formule (III) susmentionnée.

10 13. Procédé de préparation d'une protéine à activité époxyde hydrolase recombinante selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de transformation de cellules hôtes, de préférence choisies parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, avec un vecteur selon la revendication 9, et une étape de
15 purification de l'époxyde hydrolase recombinante produite par lesdites cellules.

 14. Procédé de préparation d'une protéine à activité époxyde hydrolase sous forme essentiellement pure selon la revendication 3 ou 4, ledit procédé comprenant :

- 20 - une étape d'extraction de l'enzyme à partir de cultures cellulaires de champignons, tels que les champignons de l'espèce *Aspergillus*, notamment par cassage du champignon à l'aide d'une presse, suivie d'une étape de centrifugation à faible vitesse, récupération du surnageant, et, le cas échéant concentration,

- 25 - une étape de purification de l'enzyme à partir de l'extrait obtenu à l'étape précédente, notamment par passages successifs sur des colonnes de DEAE-Sepharose, Phényl-Sepharose, Mono Q et Superose 12.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/FR 00/01217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/55 C12N9/14 C12N15/80 C12N1/15 C12P7/18
C12P7/00 C12P7/22 C12P41/00 C12P13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARCHELAS A ET AL: "Epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of fine organic chemicals"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 16, no. 3, 1 March 1998 (1998-03-01), pages 108-116, XP004108588</p> <p>ISSN: 0167-7799</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-6, 11-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 2000

Date of mailing of the international search report

05/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/FR 00/01217

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MOUSSOU P ET AL: "Microbiological Transformations 40. Use of Fungal Epoxide Hydrolases for the Synthesis of Enantiopure Alkyl Epoxides" TETRAHEDRON, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 54, no. 8, 19 February 1998 (1998-02-19), pages 1563-1572, XP004106670 ISSN: 0040-4020 the whole document</p>	1-6, 11-13
X	<p>CLEIJ M ET AL: "Microbiological transformations. Part 42: A two-liquid-phase preparative scale process for an epoxide hydrolase catalysed resolution of para-bromo-alpha-methyl styrene oxide. Occurrence of a surprising enantioselectivity enhancement" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 9, no. 11, 5 June 1998 (1998-06-05), pages 1839-1842, XP004123469 ISSN: 0957-4166 the whole document</p>	1-6, 11-13
X	<p>NELLAIAH H ET AL.: "Enantioselective hydrolysis of p-nitrostyrene oxide by an epoxide hydrolase preparation from Aspergillus niger" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 49, 1996, pages 70-77, XP002130510 cited in the application the whole document</p>	1-6, 11-13
X	<p>DATABASE EMBL3 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany; AC/ID AA784929, 8 February 1998 (1998-02-08) KUPFER D ET AL.: "An Aspergillus nidulans EST database" XP002130511 abstract</p>	7-10
P, X	<p>ARAND M ET AL.: "Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from Aspergillus niger is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 344, 15 November 1999 (1999-11-15), pages 273-280, XP000938551 the whole document</p>	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. internationale No

PCT/FR 00/01217

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/55 C12N9/14 C12N15/80 C12N1/15 C12P7/18
C12P7/00 C12P7/22 C12P41/00 C12P13/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ARCHELAS A ET AL: "Epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of fine organic chemicals"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 16, no. 3, 1 mars 1998 (1998-03-01), pages 108-116, XP004108588</p> <p>ISSN: 0167-7799</p> <p>cité dans la demande</p> <p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-6, 11-13</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Oderwald, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deman .ternationale No

PCT/FR-00/01217

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>MOUSSOU P ET AL: "Microbiological Transformations 40. Use of Fungal Epoxide Hydrolases for the Synthesis of Enantiopure Alkyl Epoxides" TETRAHEDRON,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 54, no. 8, 19 février 1998 (1998-02-19), pages 1563-1572, XP004106670 ISSN: 0040-4020 le document en entier</p>	1-6, 11-13
X	<p>CLEIJ M ET AL: "Microbiological transformations. Part 42: A two-liquid-phase preparative scale process for an epoxide hydrolase catalysed resolution of para-bromo-alpha-methyl styrene oxide. Occurrence of a surprising enantioselectivity enhancement" TETRAHEDRON: ASYMMETRY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 9, no. 11, 5 juin 1998 (1998-06-05), pages 1839-1842, XP004123469 ISSN: 0957-4166 le document en entier</p>	1-6, 11-13
X	<p>NELLAIAH H ET AL.: "Enantioselective hydrolysis of p-nitrostyrene oxide by an epoxide hydrolase preparation from Aspergillus niger" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 49, 1996, pages 70-77, XP002130510 cité dans la demande le document en entier</p>	1-6, 11-13
X	<p>DATABASE EMBL3 'en ligne! EMBL, Heidelberg, Germany; AC/ID AA784929, 8 février 1998 (1998-02-08) KUPFER D ET AL.: "An Aspergillus nidulans EST database" XP002130511 abrégé</p>	7-10
P,X	<p>ARAND M ET AL.: "Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from Aspergillus niger is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 344, 15 novembre 1999 (1999-11-15), pages 273-280, XP000938551 le document en entier</p>	1-14